인체 정상기도 상피세포에서 레티노익산 유무에 따른 리소자임 단백질의 생성률 및 반감기

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 광명성애병원 이비인후과[2]
윤주헌[1] · 홍성수[1] · 홍정표[1] · 이건영[2] · 박인용[1]

Rate of Synthesis and Degradation of Lysozyme Protein by Retinoic Acid in Normal Human Airway Epithelial Cells

Joo-Heon Yoon, MD[1], Seong-Soo Hong, MD[1], Jung-Pyoe Hong, MD[1], Geon Young Lee, MD[2] and In Yong Park, MD[1]

[1]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine,
[2]Kwang Myung Sung Ae Hospital, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : We considered two possible mechanisms that might be responsible for the increased accumulation of lysozyme in retinoic acid (RA)-deficient cultures, either increased lysozyme synthesis or decreased lysozyme degradation based on our previous data. This study was to determine whether the synthesis and decay rate of intracellular lysozyme in RA-sufficient cultures are different from those in RA-deficient cultures. **Materials and Method** : Passage-2 normal human airway epithelial cells were used. For synthesis rate of lysozyme, day 10 RA-deficient and RA-sufficient cultures, incubated over 6 hour period with ^{35}S-methionine-cysteine and cell lysates, were collected. For decay rate, day 10 cultures grown in the presence or absence of RA were labeled with ^{35}S-methionine-cysteine for 4 hours and the labeling media were then removed. Cell extracts were collected over 8 hours. Newly synthesized or labeled lysozyme was immuneoprecipitated with anti-lysozyme antibody and separated by SDS-PAGE. **Results** : Lysozyme synthesis rate in RA-sufficient cultures was higher than in RA-deficient cultures. In the RA-deficient cultures, the levels of newly synthesized lysozyme barely changed over the 8 hour post-labeling period. In contrast, in the RA-sufficient cultures, radiolabeled lysozyme levels decreased rapidly during the 8 hour post-labeling period, with a half-life of approximately 6 hours. **Conclusion** : Discrepancy in mRNA and protein of lysozyme in RA-deficient cultures is due to the increased stability of lysozyme protein in RA-deficient cultures. **(Korean J Otolaryngol 1999;42:981-4)**

KEY WORDS : Lysozyme · Synthesis · Degradation · Retinoic acid.

서 론

기도에서 상피세포의 분화조절과 점액 및 비점액성 분비의 조절에 레티노익산과 표피성장인자(epidermal growth factor)가 관여하는 것으로 알려져 있다.[1] Air-liquid interface(ALI) 배양법을 이용하여 배양액에 레티노익산 존재상태에서 배양된 정상기도상피세포가 많은 양의 점액과 적은 양의 리소자임, 락토페린 및 secretory leukocyte protease inhibitor를 분비한다고 하였다.[2-6] Gray 등[5]이 사용한 배양법은 원주형 점액섬모상피세포에 특징적인 형태를 보여주고 있으나 시험관내 실험에서 배양액에서 레티노익산을 제거하게 되면 편평상피가 생기게 되고 점액분비가 급격히 줄어든다고 하였다. 이러한 보고는 비타민 A 결핍식이가 기도에 심한 편평화생을 유발한다는 기존의 생체에서의 보고와 일치하고 있다.[7] 따라서 생체실험과 시험관내 실험 모두에서 점액섬모상피세포로의 분화를 위해서는 레티노익산이 필수적이라는 것을 의미하고 있다.

현재 상기도 질환으로 인한 사망률이 미국에서는 4위를 달리고 있고 AIDS환자나 면역이 저하된 환자들에서는 인

논문접수일 : 1998년 12월 26일 / 심사통과일 : 1999년 7월 13일
교신저자 : 윤주헌, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361-8484 · 전송 : (02) 393-0580
E-mail : jhyoon@yumc.yonsei.ac.kr

체내에 존재하는 리소자임의 양을 증가시키면 상기도 질환으로 인한 사망률과 이환율을 감소시킬 수 있어 이에 연구가 진행되고 있다. 따라서 저자들도 이에 관심을 가지게 되어 그동안 리소자임의 조절에 대한 연구를 진행하여 왔다.

저자들은 이전 연구에서 배양액에 레티노익산이 있을 때는 리소자임 mRNA가 많은데도 불구하고 리소자임 단백질은 적었고, 레티노익산이 없을 때는 mRNA는 적은데도 많은 양의 리소자임 단백질이 검출되는 흥미로운 불일치 현상을 보고한 바 있다.[6] 또한 정상기도 상피세포에서 배양시기에 따라 상피세포의 분화, 리소자임 단백질 분비 및 리소자임 mRNA 발현에 레티노익산이 미치는 영향을 규명하고자 연구를 시행하여, 리소자임 단백질이 레티노익산에 의해 직접 영향을 받지 않고 형태변화에 의한 간접적으로 영향을 받는다는 것과 레티노익산 결핍시 관찰되는 세포내 리소자임의 과다한 축적은 병적인 편평화생시에 일어나는 특이적 현상임을 보고한 바 있다.[8]

그러나 정상기도 상피세포의 편평화생시, 리소자임 mRNA는 약하게 발현되는데도 불구하고 리소자임의 세포내 과다한 축적이 일어나는 현상 즉 mRNA와 단백질의 불일치 현상이 왜 일어나는지는 알 수 없었다. 이전의 결과를 분석해 본 결과, 두가지 가능성을 생각하게 되었다. 즉 첫째, 레티노익산 결핍시 리소자임 합성이 증가하거나 둘째, 분해가 감소하거나의 두가지중 하나에 해당될 것으로 생각되었다. 이에 저자들은 레티노익산 유무에 따른 리소자임 단백질의 생성률과 반감기를 측정함으로써 불일치 현상이 일어나는 이유를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

저자들이 사용한 배양법은 반투과성 막(Transwellclear, Costar Corp., Cambridge, MA, USA)에서 ALI 배양법을 사용하였으며 사용한 배양액은 bronchial epithelial growth media(Clonetics Corp., San Diego, CA, USA)과 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) 1:1 혼합액을 기본으로 호르몬과 각종 성장인자가 첨가된 배양액을 사용하였다.[9] 리소자임 합성률을 알아보기 위해 인체 정상기도 상피세포(passage-2)를 배양액에 레티노익산(5×10^{-8}M) 유무에 따라 10일 동안 각각 배양한 후 세포내에 이미 가지고 있는 cysteine-methionine을 결핍시키기 위해 cysteine-methionine이 결핍된 배양액으로 4시간 전처치하였다. ^{35}S-labeled cysteine-methionine(50 μCi/ml, L-[Pro-mix^{TM} ^{35}S] cell labeling mix, Amersham, Arlington Heights, IL, USA)이 들어 있는 배양액으로 갈아준 후 30분, 1, 2, 3, 4, 6 시간 후에 세포용해액을 채취하였다. 리소자임의 반감기를 측정하기 위해서는 상피세포를 레티노익산(5×10^{-8}M) 유무에 따라 각각 ^{35}S-labeled cysteine-methionine을 함유하는 배양액에 4시간 동안 처치 후, 35S가 없는 3배 농도의 cysteine 및 methionine(12 mg/ml L-cysteine and 24 mg/ml L-methionine)을 함유하는 배양액으로 갈아주었다. 세포용해액을 0, 2, 4, 8 시간 후에 채취하였다. 먼저 세포들을 인산완충용액(PBS, pH 7.6)으로 세척하였으며 0.25 ml의 용해완충용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 1 mM leupeptin, 1 mM phenyl-methane-sulfonyl-fluoride, PMSF)에 용해하였다. 세포용해액을 초음파(sonication) 처리하여 균일화하였고 4℃에서 30분간 원심분리(16,000×g)하였다. 각 시료의 단백질 농도를 측정하였으며(DC protein assay, Bio-Rad) 단백질 용해액 1 mg을 4℃에서 1 ml에 10 μg의 리소자임 항체(DAKO, Carpintera, CA, USA)가 들어 있는 용액에서 하룻밤 동안 처치하였다. 면역복합체에 protein-A agarose beads(10 μg/ml reaction, Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)를 넣어 4℃에서 3시간동안 진탕기에서 흡착시킨 후 2분간 원심분리(9,000×g)하였다. 면역침전물을 먼저 완충용액 A(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 2 mM EDTA, 1 mM leupeptin, 1 mM PMSF)로 세척 후 완충용액 B(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,1% Triton X-100)로 세척하였다. 면역침전물에 2X Laemmli 시료완충용액 50 μl을 넣고 95℃에서 약 8분간 끓인 후 상층액을 15% separating 젤(acrylamide : bis=29 : 1)에서, 200 V에서 45분간 전기영동(Mini-Protean II, Bio-RAD)하였다. Running buffer는 25mM Tris(pH 8.5), 192 mM glycine 및 0.1% sodium dodesyl sulfate(SDS)를 이용하였다. 전기영동된 단백질을 나이트로셀룰로스 막에 옮긴 후 방사선 표지된 리소자임을 Storm^{TM} Phosphorimager(Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)으로 측정하였다. 방사선 표식된 리소자임을 분석프로그램(ImageQuant, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)으로 정량하였으며 결과는 인위적인 Phosphorimager 단위로 표시하였다. 이 실험은 2회 반복하여 유사한 결과를 얻었으며 대표적인 결과를 나타내었다.

결 과

리소자임 단백질의 합성률

실험날짜를 배양 10일째를 선택한 이유는 이전의 연구결

과에서 배양 10일째가 세포내 리소자임 양을 충분한 정도로 함유하고 있고, 분비된 리소자임 양은 여전히 낮은 상태이며 상피세포의 탈락도 적어 리소자임의 합성과 분해가, 분비된 리소자임의 영향없이 측정가능한 시점이기 때문이다. 레티노익산 존재상태에서는 새로 합성된 리소자임의 양은 2시간후에 측정가능하였으나 레티노익산 결핍상태에서는 4시간후에나 측정할 수 있었다(Fig. 1). 이것을 Phosphorimager로 분석한 결과, 레티노익산 존재상태에서의 리소자임 양이 1시간후에는 3배정도 많았으며 4시간후에 절정을 이루어 6배이상의 차이가 있었다.

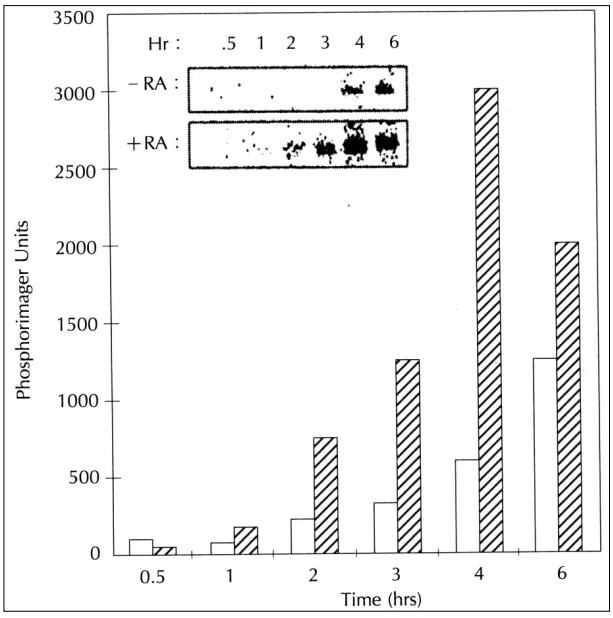

Fig. 1. The effect of RA treatment on the levels of lysozyme synthesis. Day 10, RA-deficient (▨) and RA-sufficient (■) cultures were incubated with ^{35}S methionine-cysteine for 6 hrs and lysozyme synthesis detected by immunoprecipitation (inset), was determined at the indicated times.

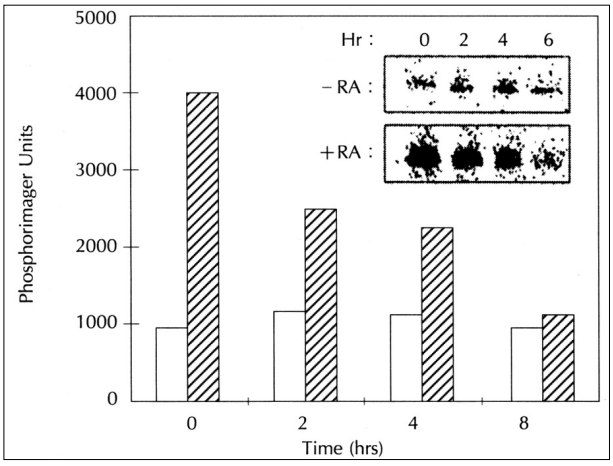

Fig. 2. The effect of RA treatment on the levels of intracellular lysozyme half-life. Lysozyme half-life was determined in day 10, RA-deficient (▨) and RA-sufficient (■) cultures which were pre-labeled for 4 hrs with ^{35}S methoinine-cysteine. Radiolabeled lysozyme was determined from immunoprecitates (inset) collected at the indicated time intervals over a 8 hr period.

리소자임 단백질의 반감기

방사선 표지된 리소자임의 단백질의 양이 0 시점에서 차이가 이미 매우 큰데, 이러한 결과는 리소자임 합성 차이에 의한 것이며(Fig. 2) 레티노익산 결핍상태에서 새로 합성된 리소자임 단백질의 양은 8시간 동안 거의 변화가 없었다(Fig. 2). 리소자임 단백질의 반감기는 레티노익산 존재상태에서는 4 8시간사이로 추정되며 레티노익산 결핍상태에서는 8시간까지도 리소자임 단백질의 양은 거의 변화가 없었다(Fig. 2).

고 찰

리소자임 mRNA의 발현 조절에 대한 분자생물학적 연구는 광범위하게 진행되어 종과 세포에 특이적인 것으로 보고되어 있고[10-12] 여러개의 cis-acting promoter와 enhancer가 분리되어 유전자 특성이 밝혀져 있다.[13] 최근 소의 리소자임 유전자의 5-flanking region에 장액성 세포의 핵단백질과 장액성 세포에 특이적인 전사에 관계된 부위가 있음이 보고되었다.[14] 리소자임 mRNA의 조절을 연구하기 위해 가장 많이 사용되는 모델은 닭의 난관과 쥐의 대식세포이다. 닭의 난관에서 리소자임 mRNA 발현은 스테로이드호르몬 의존성인데 반해 조혈계에서의 리소자임 발현은 대식세포의 성숙과 면역조절물질에 의한 대식세포의 활성화와 밀접한 관계가 있다.[10]

기도 상피세포들은 배양액에 10^{-9}M이상의 레티노익산이 있을 때는 점액섬모상피세포로 분화가 되고 레티노익산 결핍시는 편평화생이 일어났다. 저자들의 이전 연구에서,[6] 편평화생이 일어난 상피세포에서 리소자임 mRNA는 적은데 리소자임 단백질은 왜 많이 측정되는지에 대한 연구를 시행하여, 정상적인 편평화생시에는 그러한 현상이 나타나지 않는데 반해, 레티노익산 결핍으로 인한 편평화생에만 매우 많은 양의 리소자임이 측정되어 레티노익산 결핍상태에서 나타나는 리소자임의 세포내 과다한 축적은 병적인 편평화생시에만 일어나는 특이한 현상으로 생각되었고, 레티노익산이 리소자임의 발현에 직접적인 영향을 미치는 것 보다는 레티노익산이 세포의 형태에 영향을 줌으로써 간접적으로 리소자임의 발현에 영향을 준다는 것을 밝혔으나 왜 그러한 현상이 나타났는지에 대한 이유를 밝히지는 못하였다.

따라서 다음 단계로 레티노익산 결핍으로 인한 세포의 형태 변화가 어떻게 세포내 리소자임의 과다한 축적을 일으

키는지, 즉 리소자임 축적 기전을 밝히기 위해 레티노익산 유무에 따른 리소자임 단백질의 합성률과 반감기를 측정하였다. 예상과 달리, 레티노익산 존재상태에서 리소자임의 합성률이 레티노익산 결핍상태에서 보다 훨씬 높았다. 리소자임 생성 양은 점차 증가하여 4시간에 절정을 이루었고 6시간 후에는 감소하였는데 이는 생성된 리소자임이 분해되기 시작하였기 때문으로 사료된다. 그러나 레티노익산 존재상태에서 리소자임 단백질을 많이 만들어지는데 왜 측정되는 리소자임 단백질이 적게 나타났는지에 대한 의문이 여전히 남게 되었다. 이를 해결하기 위해 레티노익산 유무에 따라 리소자임 단백질의 반감기를 측정하였다. 새로이 합성되어 방사선 표지된 리소자임 단백질의 반감기에 대한 실험을 진행하여 레티노익산 결핍상태에서 레티노익산이 있는 상태보다 반감기가 6배 이상 긴 것을 관찰하였다. 이를 재확인하기 위해 새로이 합성되어 방사선 표지된 리소자임 단백질뿐만 아니라 이미 만들어져 세포내에 존재하던 리소자임 단백질을 포함하는 전체 리소자임 단백질의 반감기를 측정하기 위해 cyclohexamide 실험을 시행한 결과 동일한 결과를 얻을 수 있었다(data not shown). 따라서 레티노익산 결핍상태에서 리소자임 mRNA발현이 적은데도 불구하고 많은 양의 리소자임의 세포내 축적이 일어난 것은, 레티노익산 결핍상태에서 리소자임 합성은 적으나 그 반감기가 길어지기 때문에 합성된 리소자임 단백질이 안정성이 높아져 분해되지 않고 세포내에 계속 축적되기 때문이라고 생각되었다. 결론적으로 레티노익산 결핍상태에서 나타나는 리소자임의 세포내 과다한 축적은 리소자임의 대사장애 즉 만들어진 리소자임의 분해가 잘 되지 않음으로써 일어나는 병적인 현상으로 사료되었다.

중심단어 : 리소자임 · 합성 · 분해 · 레티노익산.

본 연구는 1998년도 연세대학교 의과대학 교수연구비에 의해 이루어졌음.

REFERENCES

1) Guzman K, Randell SH, Nettesheim P. *Epidermal growth factor regulates expression of the mucous phenotype of rat tracheal epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1995;217:412-8.*
2) Guzman K, Gray TE, Yoon JH, Nettesheim P. *Quantitation of mucin RNA by PCR reveals induction of both MUC2 and MUC5AC mRNA levels by retinoids. Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol) 1996;271:L1023-8.*
3) Davenport EA, Nettesheim P. *Type I collagen gel modulates extracellular matrix synthesis and deposition by tracheal epithelial cell. Exp Cell Res 1996;223:155-62.*
4) Davenport EA, Nettesheim P. *Regulation of mucociliary differenttiation of rat tracheal epithelial cells by type I collagen gel substratum. Am J Respir Cell Mol Biol 1996;14:19-26.*
5) Gray TE, Guzman K, Davis CW, Abdullah LH, Nettesheim P. *Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 14:104-12.*
6) Yoon JH, Gray T, Guzman K, Koo JS, Nettesheim P. *Regulation of the secretory phenotype of human airway epithelium by retinoic acid, triiodothyronine and extracellular matrix. Am J Respir Mol Cell Biol 1997;16:724-31.*
7) McDowell EM, Keenan KP, Huang M. *Restoration of mucociliary tracheal epithelium following deprivation of vitamin A. A quantitative morphologic study. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1984;45:221-40.*
8) Yoon JH, Kim KS, Lee HG, Kim SS, Hong SS, Jo SW, *et al. Effect of retinoic acid on the differentiation and lysozyme expression in human airway epithelial cells. Kor J Otolaryngol 1999; 42:39-46.*
9) Yoon JH, Kim KS, Kim SS, Lee SM, Lee JH, Lee JG. *Secretory differentiation of serially passaged normal human nasal epithelial (NHNE) cells. Kor J Otolaryngol 1998;41:1008-14.*
10) Bonifer C, Vidal M, Grosveld F, Sippel AE. *Tissue specific and position independent expression of the complete gene domain for chicken lysozyme in transgenic mice. EMBO J 1990;9:2843-8.*
11) Clarke S, Greaves DR, Chung LP, Tree P, Gordon S. *The human lysozyme promotor directs reporter gene expression to activated myelomonocytic cells in trangenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:1434-8.*
12) Grewal T, Theisen M, Borgmeyer U, Grussenmeyer T, Rupp RW, Stief A, *et al. The 6.1-kilobase chicken lysozyme enhancer is a multifactorial complex containing several cell-type-specific elements. Mol Cell Biol 1992;12:2339-50.*
13) Short ML, Nickel J, Schmitz A, Renkawitz R. *LZ gene expression and regulation. Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology. In Jolles P, editor. Basel Birkhauser Verlag;1996. p.243-57.*
14) Kai H, Takeuchi K, Ohmori H, Li JD, Gallup M, Basbaum C. *Transcriptional regulation of the lysozyme gene in airway gland serous cells. J Cell Biochem 1996;1:350-62.*